

**Isolasi dan Karakterisasi Ekspresi Gen untuk Protein Sucrose Transporter
pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*)
(Isolation and Characterization of the Expression of Gene for Sucrose
Transporter Proteins in Sugarcane Plant (*Saccharum officinarum*))**

Harianti Novita, Sumadi, Didik Pudji Restanto, Tri Agus Siswoyo^{1,2)} dan Bambang Sugiharto^{1,3)}

¹⁾ Pusat Penelitian Biologi Molekul Universitas Jember

²⁾ Staf Pengajar Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember

³⁾ Staf Pengajar Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember.

ABSTRACT

Sucrose as the major transported form of fixed carbon must be translocated from source tissue to the sites of consumption and storage or sink tissues. The translocation of sucrose is facilitated by some distinct sucrose transporters proteins (SUT). To study sucrose transporters in sugarcane, we had conducted isolation and characterization of gene encoding sucrose transporter protein. The isolation was performed with RT-PCR method using total RNA isolated from sugarcane leaf and primer designed from conservative region of SUT-cDNAs of SoSUT2A (accession number AY65599), OsSUT-1 (accession number AAP54842, OsSUT-1 mRNA (accession number XM 46477). Based on the conservative amino acids sequences of QILQQFA and MGKTEPV, the corresponding sequences of the primers for RT-PCR were: P1, (forward) 5'-CAGATCCTTCAACAGITCGC-3' and P2 (reverse) 5'-TGCCCTTTGTCTCCGGAACC-3', respectively. Agarose gel electrophoresis shown a clear single 0.5 kb cDNA band of the PCR product. Thus, the DNA was cloned into pGEMT vector (Promega) for further analysis. Sequence determination of the PCR product revealed a nucleotides sequence of 543 bp in length and has a high homology around 89%, 87.3 % and 84.8 % with maize ZmSUT-1, sugarcane SoSUT 2A and rice OsSUT-1 mRNA, respectively. We designated the cDNA as SoSUT2 and the nucleotide sequence have been submitted to GenBank data base under accession number bankit 734628. By using PSORT analysis the fragment of cDNA-SoSUT2 encoded protein may be located in the endoplasmic reticulum. To have a better understanding, the expression of SoSUT2 gene in sugarcane was determinate by RT-PCR method using total RNA isolated from leaf, petioles, stem and root and visualized the PCR product in agarose gel electrophoresis. Based on the cDNA bands intensity, it can be illustrated that the expression of SoSUT2 gene were found highest in sugarcane leafs then petioles and stem, but the expression was not found in root. Although the SoSUT2-cDNA has not been isolated in full size, the results suggest the presence of gene family of SUT in sugarcane.

Keywords : Sugarcane (*Saccharum officinarum*), sucrose transporters protein (SUT), RT-PCR, DNA sequence, gene expression.

PENDAHULUAN

Tebu adalah tanaman C₄ dan mempunyai peranan penting dalam industri gula (sukrosa). Batang tebu yang masak dapat mengakumulasi 12 sampai 16% berat basah dengan 50% berat keringnya adalah sukrosa (Bieleski, 2000). Peningkatan konsentrasi sukrosa di batang merupakan kunci program pengembangan tebu, tetapi pengetahuan tentang proses fisiologis dan genetik yang menentukan akumulasi sukrosa pada batang tebu masih sedikit diketahui.

Sukrosa merupakan hasil akhir proses fotosintesis yang ditranslokasi dari daun (*source*) ke organ yang membutuhkan (*sink*) seperti batang, buah, akar, bunga dan jaringan meristem (Ward, 2000). Pengangkutan sukrosa dalam tanaman dilakukan melalui jaringan vaskuler floem yang mempunyai beberapa tipe

sel berbeda yaitu *Sieve Elements* (SE) dan *Companion Cells* (CC). Pengangkutan sukrosa melalui SE diperankan oleh suatu protein yang dinamakan *sucrose transport protein* atau *sucrose transporter* (SUT). Protein SUT ini bertanggung jawab terhadap transportasi sukrosa melewati floem dari organ *source* ke *sink* (Lemoine, 2000).

Akumulasi sukrosa pada tanaman dipengaruhi oleh tingkat asimilasi karbon, sintesis dan degradasinya, serta distribusi sukrosa. Tingkat sintesis dan degradasi sukrosa melibatkan satu atau lebih aktivitas enzim. Biosintesis sukrosa ditentukan oleh aktivitas *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) (Huber dan Huber, 1996), dan degradasi sukrosa ditentukan oleh *invertase* dan *Sucrose Synthase* (SuSy) (Koch, 2004). Sedangkan distribusi sukrosa

dalam tanaman diperankan oleh protein transporter sukrosa (SUT) (Rae *et al.*, 2005).

Protein transporter sukrosa telah banyak dipelajari pada beberapa spesies tanaman dan berperanan dalam sistem transport sukrosa. Pada tanaman *Angiospermae* dinyatakan terdapat dua sistem transport sukrosa dengan sifat kinetik berbeda yaitu *high affinity-low capacity carrier* dan *low affinity-high capacity transporter*. Namun pada analisis *phylogenetic* dinyatakan bahwa semua transporter sukrosa (*sucrose transporter* dan *sucrose transporter like protein*) dikategorikan dalam tiga subgrup yaitu *SUT1*, *SUT2* dan *SUT4* (Kuhn, 2003). Masing-masing *SUT* terletak pada plasma membran dari *sieve element*. *SUT2* berperan sebagai sensor *putative sukrosa*, *SUT1* telah dihipotesiskan sebagai *high affinity transporter* dan *SUT4* sebagai *low affinity transporter*.

Gen penyandi SUT memiliki famili gen yang mempunyai peranan penting dalam translokasi sukrosa dari sumber (*source*) ke bagian yang memerlukan (*sink*). Beberapa gen *sucrose transporter* telah diisolasi dari tanaman spinach (Reismeier *et al.*, 1992), tomat (Barker *et al.*, 2000), kentang (Kuhn *et al.*, 2003), wheat (Aoki *et al.*, 2002) dan tebu (Rae *et al.*, 2005). Beberapa penelitian melaporkan bahwa transformasi gen SUT dari tanaman spinach dapat meningkatkan translokasi sukrosa pada yeast (Reismeier *et al.*, 1992) dan penghambatan melalui tehnik antisense SUT dapat menurunkan akumulasi karbohidrat hasil tanaman transgenik kentang (Reismeier *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan cDNA *SUT* dan karakterisasi ekspresinya pada tanaman tebu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fragment cDNA *SUT* dapat diisolasi dari daun menggunakan metode RT-PCR dengan primer yang didesign dari daerah konservatif cDNA *SUT*, dan dengan metode yang sama telah dianalisis ekspresi gen *SUT* pada tanaman tebu.

METODE

Bahan

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) varietas BL ditumbuhkan di pot-pot dan digunakan sebagai bahan tanam untuk isolasi RNA. Sesudah tanaman berumur sekitar 5 bulan diambil daun, pelepah, dan batang untuk isolasi RNA.

Isolasi RNA

Total RNA diisolasi dari daun, pelepah atau batang tebu menggunakan metode ekstraksi phenol seperti yang disebutkan oleh Sambrook *et al.*, (1989). Sekitar 5 g sampel jaringan tebu digerus dan dihaluskan menggunakan mortal dan stumpler dalam N₂ cair dan ditambahkan 15 ml buffer ekstraksi (100 mM Tris-HCl pH 9.0; 20 mM NaCl; 5 mM DTT; 1% Sarcosyl, 20 mM EDTA), 7 ml phenol dan 7 ml chloroform : isoamyl-alcohol (24:1). Campuran larutan divortex hingga homogen dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Larutan bagian atas (*upper layer*) dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 15 ml chloroform : isoamyl-alcohol, kemudian disentrifugasi selama 10 menit. Larutan bagian atas diambil lagi dan nukleotida diendapkan dengan penambahan 1/3 volume 10 M LiCl₂ dan inkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C. Sesudah sentrifugasi 12000 rpm selama 10 min pelet nukleotida disuspensikan dalam 5 ml 2 M LiCl₂. Total RNA kemudian diendapkan kembali dengan sentrifugasi dan dilarutkan dalam 0,5 ml buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). Total RNA yang didapat dimurnikan lagi dengan ekstraksi dengan PCI (phenol : chloroform : isoamil-alkohol), chloroform dan total RNA diendapkan dengan penambahan 0,1 volume 3 M sodium asetat (pH 5,2) dan 2,5 volume absolut etanol. Terakhir pelet total RNA dilarutkan dalam 50 µl TE dan disimpan pada -80°C. Kandungan RNA ditentukan menggunakan spektrofotometer dan kualitas RNA diamati dengan elektroforesis gen agarose.

RT-PCR

RT PCR dilakukan dengan prosedur seperti yang disebutkan dalam Titan Kit (Roche). Pasangan primer yang digunakan untuk isolasi cDNA *SUT* didesign berdasarkan daerah konservatif yang diperoleh dengan membandingkan (*alignment*) beberapa urutan asam amino protein SUT dari *Saccharum officinarum* (nomor akses AY165599) dan *Oryza sativa* (nomor akses XM464773 dan AAP54842) seperti terlihat pada Gambar 1. Daerah konservatif urutan asam amino yang digunakan untuk design primer adalah QILQQFA dan MGKTEPV sehingga dari kedua urutan asam amino tersebut didapat design primer P1 (*forward*) 5'-CAGATCCTTCAACAGTTCGC-3' dan P2

(reverse) 5'-TGCCCTTTGTCTCCGGAACC-3'. Sebagai cetakan (*template*) untuk sintesis cDNA digunakan total RNA yang diisolasi dari daun tebu. Program reaksi RT-PCR meliputi reaksi reverse transcriptase suhu 42°C selama 60 menit dan reaksi PCR yaitu denaturasi (94°C selama 30 detik), *annealing* (55°C selama 30 detik), *elongation* (68°C selama 2 menit) sebanyak 30 siklus. Visualisasi DNA hasil RT-PCR dilakukan dengan elektroforesis gel agarose.

Elektroforesis gel agarose

Gel agarose (1%) dibuat dengan mecairkan agarose 0,25 gr dalam 25 mL buffer TBE (45mM Tris-Borate, 1 mM EDTA pH 8) dengan pemanasan, kemudian ditambahkan ethidium bromide 0,5 µg/mL dan dicetak dalam plastik *tray*. Sesudah membeku matrik gel digunakan untuk elektroforesis dengan meletakkannya pada tangki elektroforesis yang berisi buffer TBE. Sampel DNA dicampur dengan bufer *loading* yang mengandung 0,25% bromophenolblue dan 40% sukrosa dan dimasukkan dalam sumuran (*well*) dalam matrik gel. Elektroforesis DNA dilakukan dengan menghubungkan arus listrik positif dan negatif sebesar 100 volt. Sesudah elektroforesis, visualisasi pita DNA dilakukan dengan penyinaran gel menggunakan UV *iluminator* dan pita DNA yang tampak diabadikan dengan kamera polaroid.

Kloning hasil PCR pada vektor pGEMT

Kloning DNA dilakukan dengan meligasi DNA hasil RT-PCR pada vektor pGEMT (Promega) sesuai dengan prosedur yang tercantum pada *Ligation Kit*. Ligasi dilakukan pada suhu 16°C selama 12-16 jam dan DNA hasil ligasi ditransformasikan pada sel kompeten *E. coli* DH5α (Sambrook *et al.*, 1989). Seleksi positif transforman *E. coli* dilakukan dengan *blue white selection* dengan pengecatan X-gal.

Untuk menyakinkan keberhasilan ligasi dan transformasi dilakukan isolasi plasmid dari bakteri positif transforman (koloni putih) dengan metoda *miniprep* (Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid yang terisolasi dilarutkan dalam 25 µL bufer TE dan digunakan untuk analisis enzim restriksi. Analisis enzim restriksi dilakukan dengan memotong plasmid hasil isolasi dengan enzim *EcoRI* dan memisahkan DNA hasil pemotongan dengan elektroforesis gel agarose.

Sequencing

Sequencing (penentuan urutan nukleotida) DNA hasil RT-PCR dilakukan dengan DNA sequencer *ABI PRISM Mode 310 version 3.0* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) yang ada di Lembaga Biologi Molekul Eijkman Jakarta.

Karakterisasi ekspresi gen SUT

Deteksi ekspresi gen SUT dilakukan dengan quantifikasi kandungan mRNA menggunakan metoda RT-PCR seperti yang disebutkan oleh Chelly and Kahn (1994). Sebanyak 1 µg total RNA yang diisolasi dari jaringan daun, pelepah, batang, dan akar tanaman tebu digunakan sebagai cetakan dan pasangan primer yang digunakan adalah P1-P2. Program reaksi PCR yang digunakan sama dengan untuk isolasi cDNA SUT tetapi dengan jumlah siklus reaksi hanya 15 kali. Sesudah selesai reaksi PCR, DNA yang teramplifikasi divisualisasi dengan elektroforesis agarose (1%) dan diabadikan dengan kamera polaroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk isolasi cDNA SUT dengan RT-PCR dilakukan isolasi RNA dari daun tebu. Hasil isolasi RNA dengan metode phenol menunjukan bahwa RNA yang didapat mempunyai kualitas baik. Deteksi kandungan RNA pada panjang gelombang 260 nm didapatkan konsentrasi RNA cukup tinggi (8,1 µg/µL) dan tidak atau sedikit terkontaminasi dengan protein karena ratio $A_{260/280}$ mempunyai nilai 1,8. Demikian juga elektroforesis gel agarose menunjukan pemisahan secara jelas ribosom RNA 28S dan 18S (Gambar 2A) yang menggambarkan tidak adanya degradasi RNA. Hasil serupa juga dilaporkan menggunakan metode Trizol pada *chondrosarcoma* yang mempunyai tingkat kemurnian dan kualitas RNA tinggi (Baelde *et al.*, 2001).

Isolasi cDNA SUT dilakukan menggunakan metoda RT-PCR dengan pasangan primer P1 - P2 dan cetakan total RNA yang diisolasi daun tebu. Hasil elektroforesis gel agarose terhadap DNA yang teramplifikasi sesudah RT-PCR menunjukan adanya pita tunggal DNA dengan ukuran sekitar 0.5 kb (Gambar 2B). Ukuran DNA yang teramplifikasi sesuai dengan prediksi ukuran fragment untuk cDNA SUT. Hasil ini menyatakan bahwa design primer yang digunakan sangat spesifik dan hanya cocok untuk gen SUT.

SoSUT 2A batang (AY165599)	481:VSQSALYPRDITEQRMAGPATMHPSEAAAKVPSWRDLFEPGVRRALLVGIGIQILQQFAG	540
OsSUT putative (XM 464773)	481:VSQPALYSKDIIEQRMMSGPAMIHPSEAAAKGSSWKDLFEPGVRRALLVGVGIGIQILQQFAG	540
OsSUT mRNA (AAP54842)	477:VSQPALYSKELMEQRLAGPAMVHPSQAVAKGPKWADLFEPGVKHALFVGIGIQILQQFAG	536
	*** **	
<i>Forward primer</i>		
SoSUT 2A batang (AY165599)	541:INGVLYYTPQIMEQAGVAVLISNLGLSSASASILISSVTALLMLPSIGLAMRLMDVSGRR	600
OsSUT putative (XM 464773)	541:INGVLYYTPQILEQAGVAVLLSNLGLSSASASILISSLTLLMLPSIGLAMRLMDISGRR	600
OsSUT mRNA (AAP54842)	537:INGVLYYTPQILEQAGVGVLNANIGLSSSSASILISGLTLLMLPSIGIAMRLMDMSGRR	596

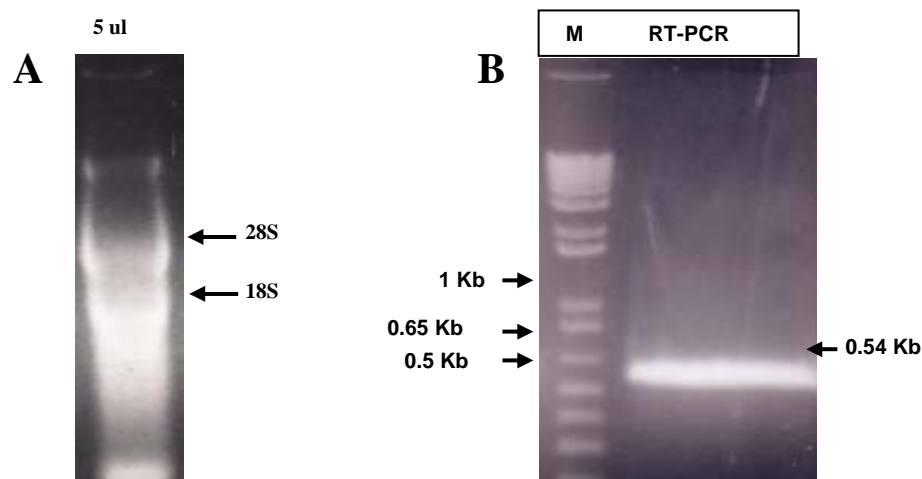
SoSUT 2A batang (AY165599)	601:FLLLTSTIPVLIASLIVLVVSNVIELGTVVHAVLSTISVITYLCCFKMGFGPIPNILCAEF	660
OsSUT putative (XM 464773)	601:FLLLTSTIPVLIASLIVLVVSNVIDLGTVAHAALSTISVITYFCCFVMGFGPIPNILCAEI	660
OsSUT mRNA (AAP54842)	597:FLLLTSTIPILIVALAILLVNILDVGTVMVHASLSTVSVILYFCFFVMGFGPIPNILCAEI	656

SoSUT 2A batang (AY165599)	661:FPTVRGICIAICALIFWVGDIIVTYSLPVMLNAIGLEGVFGIYAVACAIAFVFVYLKVP	720
OsSUT putative (XM 464773)	661:FPTVRGICIAICALTFWIGDIIVTYSLPVMLNAIGLAGVFGIYAVVCSIAFVFVFLKVP	720
OsSUT mRNA (AAP54842)	657:FPTVRGICIAICALTFWIGDIIVTYSLPVMLNAIGLAGVFGIYAVVCILAFVFMKVP	716

SoSUT 2A batang (AY165599)	721:ETKGMPLEVITEFFAVGAKQ-AVAKA	745
OsSUT putative (XM 464773)	721:ETKGMPLEVITEFFAVGAKQMQATKA	746
OsSUT mRNA (AAP54842)	717:ETKGMPLEVITEFFSVGAKQAKED--	740

<i>Reverse primer</i>		

Gambar 1. Penjajaran (*alignment*) urutan asam amino dari SoSUT 2A (AY165599), OsSUT (AAP54842), dan OsSUT (XM_464773) untuk menentukan letak primer. Tanda anterik bintang menandai kesamaan asam amino dan tanda panah *forward* dan *reverse* merupakan daerah konservatif yang digunakan untuk *design* primer P1 dan P2.



Gambar 2. Elektroforesis gel agarose (1%) total RNA daun tebu (A) dan DNA hasil RT-PCR (B). Untuk elektroforesis RNA, gel agarose dan bufer TBE disterilkan dengan autoclave dan sebanyak 5 µg total RNA dipisahkan untuk elektroforesis. M adalah marka DNA 1 Kb Ladder dan RT-PCR adalah DNA hasil amplifikasi RT-PCR. Tanda panah menunjukan posisi masing-masing RNA atau DNA dalam elektroforesis.

Untuk keperluan analisis selanjutnya dilakukan pemurnian DNA hasil RT-PCR menggunakan pemisahan elektroforesis agarose dan pengelutaran DNA dari gel agarose (*electroelution*). DNA yang didapat kemudian diligasikan pada T-vector pGEMT-easy (Promega) dan ditransformasikan ke sel *E. coli* DH5 α . Skrining positif transforman *E. coli* dilakukan dengan *blue white selection* menggunakan X-Gal dan untuk konfirmasi keberhasilan ligasi dilakukan isolasi plasmid dan pemotongan plasmid dengan enzim *EcoRI*. Elektroforesis gel agarose menunjukkan adanya fragment insersi DNA sebesar 0.5 kb (Gambar 3) dari pemotongan plasmid dengan enzim *EcoRI*. Ukuran fragmen DNA tersebut sesuai dengan ukuran DNA hasil RT-PCR yang diligasikan pada vektor pGEMT. Hal ini menunjukkan bahwa hasil RT-PCR yang sudah dikloningkan dalam vektor plasmid tersebut adalah fragment cDNA SUT. Untuk menyakinkan kebenaran fragmen DNA tersebut dilakukan penentuan urutan nukleotida (*sequencing*) menggunakan DNA *sequencer* yang terdapat di Lembaga Biologi Molekul Eijkman Jakarta.

Analisis hasil *sequencing* menggunakan *software* Genetyx menunjukkan bahwa fragmen DNA yang terinsersi pada plasmid pada plasmid pGEMT berukuran sebesar 543 bp sesuai dengan ukuran prediksinya. Urutan nukleotida (*sequence*) selengkapnya disajikan pada Gambar 4 dan sudah didaftarkan pada GenBank Data Bases (NCBI) dengan nomor akses bankit734628. Penjajaran (*alignment*) urutan nukleotida tersebut dengan DNA-SUT lain yang sudah dilaporkan menunjukkan tingkat kesamaan yang tinggi, dengan cDNA SUT jagung *ZmSUT-1* sebesar 89% (Gardiner *et al.*, 2004), batang tebu *SoSUT 2A* 87,3 % (Casu *et al.*, 2003), dan padi *OsSUT-1* 84,8 % (Kikuchi *et al.*, 2003). Hasil ini membuktikan bahwa DNA yang diisolasi dengan RT-PCR adalah fragmen DNA SUT dan selanjutnya fragmen DNA tersebut dinamakan sebagai fragmen cDNA *SoSUT2*.

Untuk mengetahui ekspresi gen SUT pada tanaman tebu dilakukan analisis RT-PCR menggunakan pasangan primer P1-P2 dan cetakan RNA yang diisolasi dari daun, pelepah, dan batang tebu. Dengan analisis RT-PCR ini dapat dideteksi ekspresi gen SUT dengan membandingkan intensitas pita DNA yang terdapat pada elektroforesis gel agarose. Gambar 5 menunjukkan hasil elektroferesis gel

agarose dari DNA hasil RT-PCR. Nampak bahwa ekspresi gen SUT ditemukan baik pada jaringan daun, pelepah, dan batang tebu tetapi tidak ditemukan pada akar tanaman tebu. Hal yang menarik bahwa apabila intensitas pita DNA hasil RT-PCR dikuantifikasikan secara sederhana, maka tampak kuantifikasi intensitas yang tidak sama (Tabel 1). Intensitas paling tinggi ditemukan pada daun dan menurun pada pelepah dan akar tanaman. Hasil ini menunjukkan bahwa walaupun ekspresi gen SUT ditemukan terdapat pada daun, pelepah dan batang, tetapi intensitas ekspresinya paling tinggi terdapat pada daun tanaman tebu.

Protein transporter sukrosa merupakan protein pembawa (*carrier protein*) yang berfungsi sebagai translokator sukrosa. Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi fragmen cDNA SUT dari tanaman tebu dengan ukuran 543 bp dan dinamakan cDNA *SoSUT2* (Gambar 4). Perbandingan urutan nukleotidanya dengan DNA-SUT yang diisolasi dari tanaman suku gramineae menunjukkan tingkat kesamaan tinggi 85 - 89%. Menggunakan analisis PSORT dapat diperkirakan signal protein dan lokasi dari protein *SoSUT2* tersebut (Nakai, 1988). Prediksi urutan asam amino protein *SoSUT2* digunakan untuk memperkirakan lokasi dari protein tersebut dengan menggunakan hubungan algoritme urutan signal yang ada dalam asam amino. Ada beberapa kemungkinan lokasi secara subseluler dalam sel tanaman seperti sitoplasma, mitokondria, peroxisome, reticulum endoplasma, aparat golgi, vakuola, membran plasma dan kloroplas. Dari hasil analisis menunjukkan bahwa protein yang disandi oleh fragmen *SoSUT2* daun tanaman tebu terletak pada reticulum endoplasma, sedangkan protein SUT yang disandi oleh *SoSUT 2A* (Casu *et al.*, 2003), *ZmSUT-1* (Gardiner *et al.*, 2004) dan *OsSUT-1* (Kikuchi *et al.*, 2003) semuanya terdapat pada membran plasma. Walaupun terdapat perbedaan lokasinya dengan protein SUT lainnya, kemungkinan hal ini disebabkan belum lengkapnya (*full size*) ukuran DNA *SoSUT2* yang didapat.

Deteksi ekspresi gen dapat dilakukan dengan analisis kandungan mRNA dengan metoda Northern Blot. Akan tetapi saat ini modifikasi RT-PCR juga dapat digunakan untuk quantifikasi kandungan mRNA (Taniguchi *et al.*, 2004). Hasil analisis RT-PCR

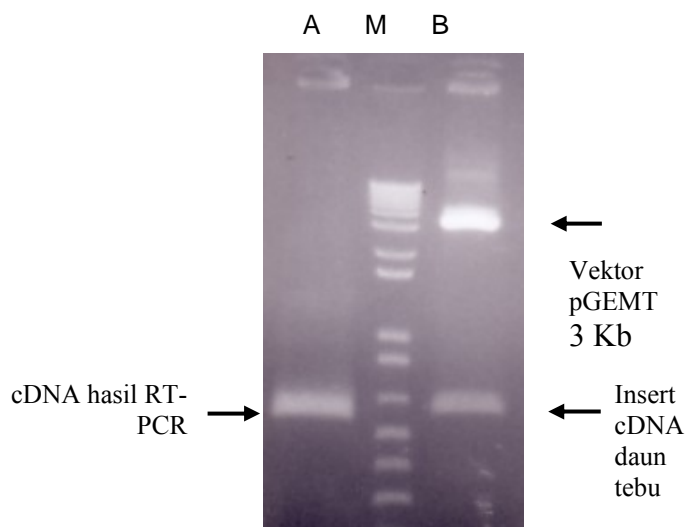
menggunakan pasangan primer P1-P2 dan cetakan mRNA yang diisolasi dari beberapa jaringan tanaman tebu menunjukkan bahwa ekspresi gen *SoSUT2* terdeteksi pada organ daun, pelepah dan batang tebu tetapi tidak ditemukan pada akar tebu (Tabel 1). Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa *SoSUT2A* merupakan gen spesifik untuk protein sucrose transporter batang tebu (Casu *et al*, 2003). Ada beberapa kemungkinan munculnya perbedaan tersebut

salah satunya adalah urutan nukleotida pasangan primer P1-P2 merupakan bagian nukleotida konservatif sehingga mampu mendeteksi gen SUT lain yang terdapat pada organ berbeda. Selain itu, ada kemungkinan bahwa *SoSUT2* yang ditemukan pada daun tebu ini merupakan tipe gen SUT lainnya yang belum pernah dilaporkan sebelumnya. Hasil ini memperkuat dugaan adanya famili gen SUT pada tanaman tebu.

Tabel 1. Tingkat ekspresi gen *SoSUT* pada jaringan tanaman tebu. Ekspresi gen dideteksi dengan metoda RT-PCR dan DNA hasil PCR dielektroforsis agarose (1%). Pita (*band*) DNA yang nampak divisualisi dengan UV *illuminator* (Gambar 6) dan intensitas pita yang tampak diberi nilai (skoring)

No	Sampel	Tingkat Ekspresi (Skor)	Keterangan
1	Akar	ND*	Tidak ada
2	Pelepah	++	Sedang
3	Daun	+++	Kuat
4	Batang	+	Lemah

*ND = *Not Detectable*



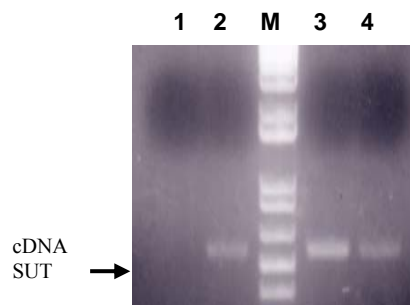
Gambar 3. Elektroforesis agarose (1%) plasmid pGEMT yang terinsersi oleh DNA hasil RT-PCR. Plasmid dipotong dengan enzim *EcoRI* dan DNA hasil pemotongan kemudian dipisahkan dengan elektroforesis (lin B). Lin A adalah cDNA hasil RT-PCR sebagai kontrol dan M, DNA makker 1 kb Ladder.

```

      10      20      30      40      50      60
CAGATCCTTCAACAGTTCTTTGGTAATAAATGGTGTCTGTACTATACCCACAAATTCT
Q  I  L  Q  Q  F  F  G  N  K  W  C  S  V  L  Y  P  T  N  S
      70      80      90      100     110     120
CGAGCAAGCTGGCGTGGCAGTTCTTCTTTTCAATCTTGGTCTCAGCTCGGCATCAGCATC
R  A  S  W  R  G  S  S  S  F  Q  S  W  S  Q  L  G  I  S  I
      130     140     150     160     170     180
CATCTTGATCAGTTCTCTCACTACCTTATCAATGCTTCCCAGCATTGGCTTAGCCATGAG
H  L  D  Q  F  S  H  Y  L  I  N  A  S  Q  H  W  L  S  H  E
      190     200     210     220     230     240
ACTTATGGATCTTTCTGGAAGAAGGTTTTTGTCTGCTAGGCACAATTCCAATCTTGATAGC
T  Y  G  S  F  W  K  K  V  F  A  A  R  H  N  S  N  L  D  S
      250     260     270     280     290     300
ATCTTTAGTTATCCTGGTCGTGTTCAATGTTATTGACTTGGGTACAGTGGCCCATGCTGT
I  F  S  Y  P  G  R  V  Q  C  Y  G  L  G  Y  S  G  P  C  C
      310     320     330     340     350     360
GCTCTCCACAGTCAGTGTCACTACCTCTGCTGCTTTGTCATGGGATTTGGTCCCAT
A  L  H  S  Q  C  H  H  L  P  L  L  L  C  H  G  I  W  S  H
      370     380     390     400     410     420
CCCCAACATTCTATGTGCAGAGATCTTTCCAAGTGGGTTTCGCGGTCTCTGCATTGCCCA
P  Q  H  S  M  C  R  D  L  S  N  R  G  S  R  S  L  H  C  P
      430     440     450     460     470     480
TCTGTGCCTTGACATTTTTGGGAAGGGAGAACATCATTGTCACCTACAGCCTTTTTGGTG
S  V  P  G  H  F  W  E  G  R  T  S  L  S  P  T  A  F  L  V
      490     500     510     520     530     540
AGGCTGAAAGCTATGGGACTAAGCGGGTGTTTTGGCCATATAGGCAACCCATAGGCTGAA
R  L  K  A  M  G  L  S  G  C  F  G  H  I  G  N  P  Y  A  E
      550
TGG
W

```

Gambar 4. Urutan (sequence) nukleotida dan prediksi urutan asam amino fragmen cDNA SoSUT2 yang diisolasi dari daun tebu. Ukuran fragmen cDNA sebesar 543 bp dan menyandi untuk 181 asam amino. Urutan nukleotida cDNA SoSUT2 telah didaftarkan ke GenBank dengan nomor akses bankit734628.



Gambar 5. Elektroforesis gel agarose (1 %) DNA hasil RT-PCR. Analisis ini ditujukan untuk analisis ekspresi gen SUT pada tanaman tebu. RT-PCR dilakukan dengan cetakan total RNA (1 µg) yang diisolasi dari (1) Akar, (2) Pelepah, (3) Daun, (4) Batang. M, marker DNA 1 kb Ladder. Intensitas pita DNA hasil RT-PCR menunjukan tingkat ekspresi gen SUT.

Keberhasilan isolasi dan deteksi gen *SoSUT2* pada tanaman tebu membuka kesempatan baru untuk melakukan isolasi dan analisis famili gen SUT pada tanaman tebu. Seperti dilaporkan pada beberapa spesies tanaman bahwa terdapat beberapa famili gen SUT yang mempunyai fungsi dan karakter fisiologis berbeda. Oleh karena itu, isolasi dan karakterisasi *full size* famili gen SUT merupakan langkah selanjutnya yang akan dilakukan pada penelitian ini. Menggunakan metoda RACE (*rapid amplification cDNA end*) diharapkan dapat diisolasi *full size* gen *SoSUT2*, seperti dilaporkan sebelumnya (Sugiharto *et al.*, 2002).

Akumulasi sukrosa secara fisiologi pada tanaman tebu tidak hanya penting untuk mempelajari pembagian dan penyediaan karbohidrat tetapi secara agronomi juga penting pada proses produksi sukrosa. Untuk itu strategi untuk memanipulasi akumulasi sukrosa perlu diketahui (Grof and Campbell, 2001). Tersedianya cDNA SUT dimungkinkan untuk dapat mempelajari maupun melakukan manipulasi akumulasi sukrosa pada tanaman. Dalam hubungannya dengan manipulasi peningkatan akumulasi karbohidrat dilaporkan bahwa overekspresi gen SUT dapat meningkatkan kandungan pati pada tanaman umbi-umbian (Reismeiler *et al.*, 1994). Sejalan dengan penelitian tersebut, diharapkan overekspresi gen SUT pada tanaman tebu dapat meningkatkan translokasi dan akumulasi sukrosa pada batang tanaman tebu.

Strategi lain untuk meningkatkan akumulasi sukrosa dapat dilakukan dengan overekspresi gen SPS yang menyandi untuk sucrose-phosphate synthase, enzim kunci sintesis sukrosa pada tanaman. Over ekspresi gen SPS dapat meningkatkan sintesis dan akumulasi sukrosa pada tanaman tomat (Worrell *et al.*, 1991), tembakau (Miswar *et al.*, 2005) dan tebu (Miswar *et al.*, 2006 *in preparation*). Oleh karena itu, secara keseluruhan diharapkan *double* overekspresi gen SPS dan SUT akan meningkatkan sintesis dan translokasi sukrosa pada batang tanaman tebu, yang pada gilirannya akan didapat varietas tebu baru rendemen atau produktivitas gula tinggi.

Kesimpulan

Isolasi cDNA *sucrose transporter proteins* dari daun tebu menggunakan metoda RT-PCR telah berhasil dilakukan dan disebut sebagai cDNA *SoSUT2*. Walaupun masih berukuran 543 bp dan belum *full size*, urutan nukleotida cDNA

SoSUT2 telah didaftarkan ke GenBank dengan nomor akses bankit 734628. Ekspresi gen *SoSUT2* banyak diketemukan di jaringan daun sedikit di tangkai daun dan batang, tetapi tidak diketemukan di akar tebu. Hasil ini menunjukkan bahwa gen *SoSUT2* kemungkinan berperan penting pada transport sukrosa dalam jaringan tersebut, kecuali di akar.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Penelitian Tim Pascasarjana Dirjen Dikti Departemen Pendidikan Nasional Tahun Anggaran 2005-2007, dengan Ketua Peneliti Bambang Sugiharto

DAFTAR PUSTAKA

- Aoki N., P. Whitfeld., F. Hoeren., G. Scofield., K. Newell., J. Patrick., C. Offler., B. Clarke., S. Rahman and RT. Furbank. 2002. Three sucrose transporter genes are expressed in the developing grain of hexaploid wheat. *Plant mol Biol* **50** : 453-62.
- Barker L., C. Kuhn., A. Weise., A. Schulz., C. Gebhardt., B. Hirner., H. Hellmann., JM. Ward and WB. Frommer, 2000. SUT2, a Putative sucrose sensor in sieve elements, *The Plant Cell* **12** : 1153-1164
- Baelde HJ., AMC. Jansen, H. van Beerendonk, M. Namba, JVMG. Bovee, PCW Hogendoom (2001) High quality RNA isolation from tumours with low cellularity and high extracellular matrix component for cDNA microarrays; application to Chondrosarcoma. *J. Clin Pathol.* **54** : 778-782.
- Bielecki RL. 2000. The Bigger Picture Phloem Seen Through Horticultural Eyes. *Aust J. Plant Physiol* **27** : 615-624.
- Casu RE., C. Grof., AL. Rae., CL. McIntyre., CM. Dimmock and JM. Manners, 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequencetag and microarray analysis, *Plant Mol Biol* **0** : 1-16.
- Chelly and Kahn (1994) RT-PCR and mRNA Quantitation. In Mullis *et al.*, (Eds) *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhauser Boston, USA, p 97-109.

- Lingle S. E, 2002. *Cloning and expression of a sucrose transporter gene in Yeast, Plant Animal and Microbe Genomes X Conference Town and Country Convention Center*. San Diego, CA
- Gardiner J., Schroeder, S., Polacco, M.L., Sanchez-Villeda, H., Fang, Z., Morgante, M., Landewe, T., Fengler, K., Useche, F., Hanafey, M., Tingey, S., Chou, H., Wing, R., Soderlund, C. and Coe, E.H. Jr., 2004. Anchoring 9,371 maize expressed sequencetagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. *Plant Physiol* **134** : 1317-1326
- Grof CPL and Campbell JA., 2001. Sugarcane metabolism: scope for molecular manipulation. *Aus. J Plant Physiology* **28** : 1-12.
- Huber S.C and J.L. Huber, 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47** : 431-444
- Kikuchi S., Satoh, K., Nagata, T., Kawagashira, N., 2003. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science* **301** : 376-379.
- Kuhn C., MR. Hajirezaie., AR. Fernie., UR. Tanuli., T. Czechowski., B. Hirner and WB. Frommer, 2003. The sucrose transporter StSUT1 localize to seive elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol* **131** : 102-113.
- Kuhn C., 2003. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biol* **5** : 215-232.
- Koch K. 2004. Sucrose metabolism : Regulatory mechanism and pivotal role in sugar sensing and plant development. *Plant Biology* **7** : 235-246.
- Lemoine R., 2000. Sucrose Transporter in Plant : Update on Function and Structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465** : 246-262.
- Li CH, JX Shi, D. Weiss and EE. Goldschmidt, 2003. Sugar regulate sucrose transporter gene expression in citrus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306** : 402-407.
- Nakai K, 1998. *Prediction of Protein Sorting Signal and Localization Sites in Amino Acid Sequences*. PSORT WWW Server
- Miswar, B. Sugiharto, J. Soedarsono, dan S. Moeljoprawiro, 2005. Transformasi gen sucrose-phosphate synthase tebu (*SoSPS1*) untuk meningkatkan sintesis sukrosa pada daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). *Biologi* **4** : 337-348
- Rae AL., JM perroux, CPL. Grof, 2005. Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem. A potensial role for the ShSUT1 Sucrose Transporter. *Planta* **220** : 817-825.
- Riesmeier JW., L. Willmitzer and WB. Frommer, 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO Journal* **11** : 4705-4713
- Riesmeier JW., L. Willmitzer and WB. Frommer, 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate portioning. *The EMBO Journal* **13** : 1-7
- Sambrook J., EF. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual* (Second edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sugiharto B., N. Ermawati, H. Mori, K. Aoki, K. Yonekura-Sakakibara, T. Yamaya, T. Sugiyama, and H. Sakakibara, 2002. Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. *Plant Cell Physiology* **43** : 350-354
- Taniguchi Y., J. Nagasaki, M. Kawasaki, H. Miyake, T. Sugiyama and M. Taniguchi, 2004. Differentiation of decarboxylase transporters in mesophyll and bundle sheath chloroplast of maize. *Plant Cell Physiol* **45** : 187-200

- Ward J. M. 2000. *The Role of Sucrose Transporter in Assimilate partitioning and Phloem Function*. *Plant Physiology*, Center for Plant Molecular Biology, University of Tuebingen, Auf der Morgentelle 1, 72076 Tuebingen, Germany
- Worrell- A.C., J.M. Bruneau, K. Summerfelt, M. Boersig, and T. Voelker, 1991. Expression of maize sucrose phosphate synthase in tomato alter leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* **3** : 1121-1130